EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS VON PAPIER- ELEKTROPHORETISCH GEWONNENEN AVIDINFRAKTIONEN AUF DIE FETTSÄURESYNTHESE IN VITRO

Andreas Pilger

1967

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554023_0105

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Professor Dr. W. SEITZ

Experimentelle Untersuchungen über den Einfluß von papier- und elektrophoretisch gewonnenen Avidinfraktionen auf die Fettsäuresynthese in vitro

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Andreas Pilger
aus Gauting

München 1967

LEIDIG-DRUCK, 8000 München 25, Schöttlstr. 9, Tel. 772633

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Professor Dr. W. SEITZ

Dekan: Professor Dr. M. KIESE

Tag der mündlichen Prüfung: 7.7.1967

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

MEINER MUTTER

INHALT

	Seite
Einleitung	7
Problemstellung und Zielsetzung	12
Experimenteller Teil	13
Ergebnisse	16
Diskussion	32
Zusammenfassung	34
Literatur	36

EINLEITUNG

Die Umwandlung anderer Nährstoffe in Fett im tierischen Organismus gehört zu den ältesten gesicherten Befunden der Stoffwechselphysiologie. Auch bei völligem Fehlen von Fett in der Nahrung werden überschüssig zugeführte Nährstoffe als Fett gespeichert, gleichgültig, ob der Organismus sie in Form von Eiweiß oder Kohlenhydraten erhalten hat. Neben der Leber vermögen auch andere Organe wie Darm, Fettgewebe, Milz, Niere, Arterienwand und Testis Fett zu bilden. Lediglich die mehrfach ungesättigten Fettsäuren (essentielle Fettsäuren) müssen als solche oder in Form ihrer Stoffwechselvorläufer dem tierischen Organismus zugeführt werden.

DER MECHANISMUS DER FETTSÄURESYNTHESE

Ausgangssubstanz der Biosynthese der langkettigen gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren ist das zentrale Zwischenprodukt des Kohlenhydrat-, Eiweiß- und Fett-Stoffwechsels, die aktivierte Essigsäure (Acetyl-CoA). Die langkettigen gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren sind nicht nur als Reservestoffe des Energie-Haushaltes von Bedeutung, sie stellen auch essentielle Bestandteile der in die subzellulären Membranstrukturen eingebauten Phosphatide und anderer Lipoide dar (Übersicht siehe: ANSELL und HAWTHORNE 1964).

Grundsätzlich lassen sich zwei Synthesewege zur Bildung der langkettigen Fettsäuren in der Zelle unterscheiden. Das erste System ist in den Mitochondrien und/oder Mikrosomen lokalisiert und verlängert bereits vorhandene Acyl-CoA-Homologe um jeweils eine C_2-Einheit. Auf diese Weise werden aus den Fettsäuren mit sechzehn bis achtzehn C-Atomen die C_{20}-, C_{22}- und C_{24}-Fettsäuren aufgebaut.
Da sich die Verlängerungsreaktion im Inneren der Mitochondrien abspielt und die Mitochondrienmembranen undurchlässig für Acyl-CoA-Verbindungen sind, müssen deren Fettsäure-Anteile an Carnitin gekoppelt werden, um in das Innere der Mitochondrien gelangen und dort verlängert werden zu können (SPENCER u. Mitarb. 1962; NORUM 1963).

Die de-novo-Synthese der Fettsäuren aus Acetyl-CoA geschieht dagegen extramitochondrial im freien Cytoplasma bei Anwesenheit von Bicarbonat, Mn-Ionen und Citrat und unter Beteiligung von NADPH sowie ATP. Als Endprodukt dieser Reaktionen entsteht im Säugetierorganismus hauptsächlich

Palmitinsäure neben kleineren Mengen Myristin- und Stearinsäure. Nach LYNEN und SCHWEIZER (SCHWEIZER 1965) läuft der ganze Vorgang an einem Multienzymkomplex ab, an den die jeweilige Carboxylgruppe durch Thioesterbindung kovalent gebunden ist. Erst nach Erreichen der endgültigen Kettenlänge wird die synthetisierte Fettsäure dann als CoA-Verbindung freigesetzt, d.h. es treten keine Zwischenprodukte in freier Form auf. Die Summengleichung dieser "Synthetase"-Reaktion lautet:

$$\text{Acetyl-CoA} + 7\ \text{Malonyl-CoA} + 14\ \text{NADPH} + 14\ H^+ \longrightarrow$$
$$\text{Palmityl-CoA} + 7\ \text{CoA} + 7\ CO_2 + 14\ \text{NADP}^+$$

Dabei dient die aktivierte Essigsäure als Startermolekül, an das unter CO_2-Abspaltung eine entsprechende Anzahl von Malonyl-CoA-Molekülen angehängt werden. Diese werden in einer vorgeschalteten Carboxylierung durch Fixation von anorganischem Bicarbonat an Acetyl-CoA gebildet (Acetylcarboxylase-Reaktion). Die Acetyl-CoA-Carboxylase enthält als prostethische Gruppe Biotin, ist also ein konjugiertes Protein. Einzelschritte zur Bildung des CO_2-Biotin-Komplexes sind nach LYNEN u. ROMINGER 1963; KAZIRO u. Mitarb. 1962; VALLOTON u. LEUTHARDT 1964:

A_1 $\quad$ $\text{Biotin} + \text{ATP} \overset{Mg^{2+}}{\rightleftharpoons} \text{Biotin} \sim \text{AMP} + \text{P-P}$
(Biotinadenylsynthetase)

A_2 $\quad$ $\text{Biotin} \sim \text{AMP} + \text{E} \rightleftharpoons \text{Biotin} \sim \text{E} + \text{AMP}$
(E = Apoferment der Acetylcarboxylase (GIBSON 1963))

A_3 $\quad$ $\text{Biotin} \sim \text{E} + HCO_3^- + \text{ATP} \overset{Mg^{2+}}{\rightleftharpoons} CO_2\text{-Biotin} \sim \text{E} + \text{ADP} + \text{P}$
Die Übertragung des CO_2 auf das Acetyl-CoA erfolgt dann nach

B $\quad$ $CO_2\text{-Biotin} \sim \text{E} + \text{Acetyl-CoA} \xrightarrow{\text{Isocitrat}} \text{Malonyl-CoA} + \text{Biotin} \sim$
Danach lautet die Summengleichung für die Acetyl-Carboxylase

$$\text{Acetyl-CoA} + \text{ATP} + CO_2 \longrightarrow \text{Malonyl-CoA} + \text{AMP} + \text{P-P}$$

DIE REGULATION DER FETTSÄURESYNTHESE

Das Ausmaß der Fettsäuresynthese ist in Abhängigkeit von zahlreichen Faktoren in vivo und in vitro bereits häufig untersucht worden (Übersicht siehe: MASORO 1962). Nach allen vorliegenden Befunden ist die Carboxylase-Reaktion der geschwindigkeitsbegrenzende Schritt. Darauf wiesen erstmals die Versuchsergebnisse von NUMA u. Mitarb. (1961) hin. Sowohl das beteiligte Enzym aus Leber (LYNEN u. Mitarb. 1963), als auch das aus Fettgewebe (MARTIN u. VAGELOS 1962) benötigt Citrat zur vollen Entfaltung seiner Wirksamkeit (siehe auch WHITE u. KLEIN 1965). Auch Isocitrat zeigte einen ähnlichen Effekt (WAKIL 1965). Dabei ist das Citrat nicht etwa als Substrat oder ähnliches direkt an der Umsetzung beteiligt, sondern dient nach LYNEN wahrscheinlich zur Konformationsänderung des Enzymproteins im Sinne einer Aktivierung des katalytischen Zentrums (NUMA u. Mitarb. 1965). Von derartigen "allosterischen" Enzymen sind inzwischen eine Reihe bekannt geworden (WIELAND u. Mitarb. 1965).

Einen stimulierenden Effekt auf dieses Enzym konnte in vitro auch durch Mitochondrien- (THIFFE u. MYANT 1964) und Mikrosomenzugabe (CHAIKOFF u. ABRAHAM 1963) erreicht werden. Bei alloxandiabetischen Ratten war die Mikrosomenzugabe weniger als halb so wirksam. Übersicht siehe: (GIBSON 1963).

Eine Hemmung der Acetyl-Carboxylase wird bei Anwesenheit von Coenzym A-Thioester höherer Fettsäuren erreicht (BORTZ u. Mitarb. 1963; BORTZ u. LYNEN 1963). Die Empfindlichkeit dieses Effektes liegt bereits in einem Konzentrationsbereich, der den zellphysiologischen Größenordnungen entspricht.
WIELAND diskutiert deshalb die Acyl-CoA-Verbindung als Regulatoren der Fettsäuresynthese im Sinne einer "feed-back"-Hemmung und gibt eine Reihe von Argumenten für diese These (WIELAND u. Mitarb. 1965). Da die Acyl-CoA-Verbindungen auch eine Hemmwirkung auf die Citrat-Synthese ausüben (TUBBS 1963; WIELAND u. WEISS 1963), kommt eine doppelte Beeinflussung der Acetyl-CoA-Carboxylase zustande; eine direkte hemmende und eine indirekt über die Verringerung des aktivierenden Citrats wirkende.

Die prosthetische Gruppe der Acetyl-CoA-Carboxylase ist - wie auch in einigen anderen C-1-Körper übertragenden Enzymen - das Biotin (WAKIL u. Mitarb. 1958). Biotin läßt sich nun unter Verlust seiner Enzymaktivität mit Avidin zu einem stabilen Komplex mit einem Avidin/Biotin-Verhältnis von 1 : 3 (MELAMED u. GREEN 1963) binden. Diese Inaktivierung des

enzymalen Biotins ist von WAKIL u. Mitarb. (1958) und von LYNEN u. Mitarb. (1959) zum Nachweis der chemischen Natur der funktionellen Gruppe in der Acetyl-CoA-Carboxylase benutzt worden.

AVIDIN

Beim Avidin handelt es sich um einen von EAKIN u. Mitarb. (1940) entdeckten Eiweißbestandteil des Eiklars, der hier in einer Konzentration von 0,052 % des Gesamteiweißes vorliegt.

FRAENKEL-CONRAT u. Mitarb. (1952) konnten drei Arten von Avidin aus Eiklar isolieren:

1. eine DNS enthaltende Komponente
2. das Albumin-ähnliche Protein
3. einen Komplex von Avidin mit einem sauren Glykoproteid, der H_2O unlöslich ist.

WOOLEY u. LONGSWORTH (1942) fanden bei der Elektrophorese von Avidin im pH-Bereich 1,05 - 10,35 eine elektrophoretische Hauptkomponente und eine kleine, schneller wandernde Fraktion. Die isoelektrischen Punkte lagen bei pH 10,0 bzw. 3,6 - 5,3.

MELAMED u. GREEN (1963) führten in ihren Versuchen die Reinigung mit Carboxymethylcellulosesäulen durch. Dabei ergaben sich keine Komplikationen durch Komplexbildung, wie sie bei FRAENKEL-CONRAT beschrieben waren. Vermutlich konkurriert die Carboxymethylcellulose als saures Polymerisat wirksam um das Avidin mit anderen sauren Makromolekülen.

Das Molekulargewicht des Avidins liegt bei etwa 1/3 der unteren Grenze der früher veröffentlichten Werte (55 000 - 70 000) und besagt, daß ein Molekül Avidin drei Moleküle Biotin bindet.

Mit einer Amberlite CG 50 Säule konnten MELAMED u. GREEN drei Komponenten A, B und C mit Avidincharakter isolieren bei Verwendung eines Boratpuffers von pH 10. A und B hatten eine gleichstarke Aktivität, die von C lag etwas darunter, was allerdings an assoziierten Verunreinigungen liegen kann. Eine Differenzierung von Avidin A und B kann nicht durch die Biotinbindungskapazität gewonnen werden, diese ist identisch. Beide Komponenten unterscheiden sich nur durch ihre Aminosäureanordnung; Avidin B enthält etwas mehr Arginin und Lysin. Es bleibt dahingestellt, ob dieser Unterschied vom verschiedenen Ursprung der Eier herrührt. Die Komponenten zeigen

eine Zusammensetzung aus Aminosäuren mit 10 % Kohlenhydratresten. Die drei Untereinheiten haben jeweils ein Molekulargewicht von 17 900.

In einer weiteren Arbeit zeigte GREEN (1963 b) die Rolle des Tryptophans im Biotinbindungsmechanismus. Es waren vier Tryptophanreste pro Molekül Biotin nötig.

Kinetische Messungen erwiesen, daß die Geschwindigkeitskonstante für die Bildung des Avidin-Biotin-Komplexes mit $7 \cdot 10^{7}$ /Mol x sec. in derselben Größenordnung liegt, wie die Konstanten für eine Reihe von Enzym-Substrat-Komplexen. Die Geschwindigkeitskonstante für die Dissoziation war sehr gering $9 \cdot 10^{-8}$ /sec. Dies erklärt die scheinbare Irreversibilität für die Avidinhemmung von Biotin enthaltenden Enzymen. Die Dissoziationskonstante des Komplexes ergibt sich als 10^{-15} M (GREEN 1963 a).
Von Seiten des Biotins ist zur Bildung des Avidin-Biotin-Komplexes der erhaltene Ureido-Ring wichtig, während dem Thiophan-Ring hierfür keine Bedeutung zukommt (GREEN 1963 b).

PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Wegen seiner spezifischen Wirkung auf die Acetyl-CoA-Carboxylase, die ihrerseits der limitierende Teilschritt der Synthese ist, erhebt sich die Frage, ob das Avidin als Regulator der Fettsäuresynthese - wenigstens bei Vögeln - eine biologische Bedeutung besitzt. Es wären wahrscheinlich dazu intrazelluläre Konzentrationen ausreichend, die unter den bisher möglichen Nachweisgrenzen für Avidin liegen, so daß eine derartige Möglichkeit wegen Mangel an Gegenbeweisen nicht von vornherein auszuschließen ist.

Es sollte deshalb

1) untersucht werden, ob präparativ aufgearbeitetes Avidin sich papierelektrophoretisch auftrennen läßt, und wie sich die einzelnen Komponenten in Abhängigkeit vom pH verhalten. Verschiedene Avidinpräparate sollten am Ende und in der Mitte der Elektrophoresestreifen aufgetragen und sowohl anodisch wie kathodisch getrennt werden. Weiter ist zu fragen, ob sich die verschiedenen Fraktionen gleichmäßig anfärben.

Um die regulatorische Bedeutung erkennen zu können, untersuchten wir

2) die Wirkung von Avidin und dessen papierelektrophoretisch getrennten Fraktionen auf die Fettsäuresynthese. Wir wollten erfahren, ob das Avidinpräparat vor der Auftrennung die gleiche Wirkung wie dessen elektrophoretische Banden zeigt.

Die dritte Frage, die uns beschäftigte,

3) war das elektrophoretische Verhalten des Avidins im Vergleich mit Humanserum. Es sollte festgestellt werden, ob Avidin bei der gemeinsamen Trennung mit Seren eine eigene Fraktion bildet oder ob es im Bereich der bekannten Serumeiweißbanden wandert. Im letzteren Fall müßte man zu klären versuchen, ob die Serumeiweiße Transportfunktion für das Avidin besitzen oder ob letzteres als solches die gleichen elektrophoretischen Eigenschaften wie jene hat.

EXPERIMENTELLER TEIL

Versuchstiere

Das Enzymsystem wurde aus Taubenlebern hergestellt, die eine relativ hohe Syntheseaktivität für Fettsäure besitzen. Wir verarbeiteten Lebern von Tieren, die zuvor ad libitum mit Weizenkörnern gefüttert wurden.

Reagentien

^{14}C-Acetat als Natriumsalz
New England Nuclear Corp. Boston, USA

Avidin
Nutritional-Biochemical Corp. Cleveland/Ohio, USA
Fa. Serva, Heidelberg

Coenzym A, $NADPH_2$ und ATP
Fa. Boehringer, Mannheim

Alle übrigen Präparate waren p.a. Reagentien der
Fa. E. Merck, Darmstadt

Herstellung des Enzymsystems:

Etwa 10 - 15 Tauben wurden dekapitiert, die Lebern entnommen und in eisgekühlte 0,9prozentige NaCl-Lösung gelegt. Es folgte die Entfernung des anhaftenden Bindegewebes. Die auf Filtrierpapier abgetrockneten Lebern werden nach dem Wiegen - zur Berechnung der zuzusetzenden Puffermenge - möglichst klein geschnitten. All diese Arbeitsgänge erfolgten unter Eiskühlung.

Zur Darstellung des zellfreien Enzymsystems - supernatant fraction - wird der abgewogenen Lebermenge im Verhältnis 1 : 1,2 ein Puffergemisch folgender Zusammensetzung zugesetzt:

11,876 g $NaHPO_4$, 9,0 g KH_2PO_4, 7,0 $KHCO_3$ auf 1000 ml Aqua bidest.

Dieses Gemisch wurde mit einem "Potter-Elvehjem-Homogenisator" mäßig schnell, aber ausreichend lange in kleinen Portionen homogenisiert, wodurch eine weitgehende Zerstörung der Zellwände erreicht wurde. Das

Homogenat wurde nun 30 min lang in einer Kühlzentrifuge (Firma Christ, Osterode) bei 0 °C und 3000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Die obere Fettschicht wurde abgehoben; der Überstand mit dem schon vorher verwandten Puffer verdünnt, um den Flüssigkeitsverlust beim Zentrifugieren auszugleichen.

Anschließend wurde in einer Ultrazentrifuge (Modell L der Firma Beckman Instruments, München) bei 0 °C und 30.000 U/min 75 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und gefriergetrocknet.

Inkubation:
Die Durchführung der in vitro-Versuche zur Fettsäuresynthese erfolgte im Warburg-Apparat.

Dazu wurden in die Inkubationströge Papierschnitzel der Avidinfraktionen und das Enzymsystem mit verschiedenen Zusätzen gebracht und die Gefäße 3 Stunden lang bei 37 °C bewegt.

Jeder Ansatz mit 3,55 ml Gesamtvolumen bei einem pH 7,2 - 7,4 (der konstant gehalten wird) bestand aus:

0,1 g Enzymtrockenpulver
2,1 ml Aqua bidest.
0,1 ml $MgCl_2$
0,3 ml Natriumcitrat
0,4 ml CoA
0,05 ml NADPH
0,1 ml ATP
0,4 ml aktives Acetat

Verseifung:
Nach der dreistündigen Inkubation wurde der Inhalt der Warburg-Kölbchen mit 7 ml Aqua bidest., 6 Plätzchen KOH und 5 ml 1%iger äthanolischer Palmitinsäure versetzt und die enthaltenen Fettsäuren durch Kochen bei 80 °C verseift.

Nach zweistündiger Verseifung wurde die abgekühlte Lösung in Schütteltrichter übergeführt und mit 18 % HCl angesäuert. Durch dreimaliges Ausschütteln mit 20 ml Petroläther (Kp 30 - 50 °C) wurden aus dem Verseifungsgemisch die langkettigen Fettsäuren extrahiert, die petrolätherische Lösung im Wasserbad eingedampft und der Rückstand mit Petroläther auf ein Volumen von 25 ml gebracht.

Radioaktivitätsbestimmung:
Von den 25 ml wurden je 3 x 0,5 ml auf eine Kupferplatte (Ø 2,5 cm), die in einem Aluminiumschälchen lag, aufgetropft und das Lösungsmittel unter einer Infrarotlampe abgedampft. Die Messung von jeweils 30 gegossenen Plättchen erfolgte im Methandurchflußzählrohr FH 407 der Firma Frieseke & Hoepfner, Erlangen-Bruck. Es wurden jeweils 10^3 oder 10^4 Impulse gezählt.

Papierelektrophorese:
Die papierelektrophoretische Auftrennung der Avidin-Präparate und der Seren wurde in dem Elphor-Elektrophoresenapparat der Firma Bender & Hobein, München, vorgenommen.

Für Serumauftrennungen wurde Veronalpuffer pH 8,6 verwendet. Avidinauftrennungen im Bereich pH 2,0 - 12,0 wurden mit Teorell-Stenhagen-Puffer durchgeführt.

Im Bereich pH 5,0 - 8,0 wurde mit Sörensen-Phosphat-Puffer gearbeitet.

Der Puffer für pH 3,0 (siehe Teil 2 der Ergebnisse) wurde mit Sörensen-Citrat-Puffer hergestellt. Nach dem Trocknen wurden die Elektrophoresestreifen mit Amidoschwarz angefärbt, um die Lage der einzelnen Banden differenzieren zu können.

ERGEBNISSE

1. Auftrennung von Avidin:

In unseren Versuchen wurden zwei verschiedene pulverförmige Avidinpräparate der Firmen Nutritional-Biochemical Corp., Cleveland/Ohio, USA und der Firma Serva, Heidelberg, papierelektrophoretisch aufgetrennt.

Der erzielte Trenneffekt ist schematisch in den Abb. 1 - 3 wiedergegeben. Da eine exakte quantitative Auswertung der Elektropherogramme keine eindeutigeren Ergebnisse brachte, ist die Farbintensität der Substanzbanden in folgender Weise angegeben: Die am stärksten angefärbten Banden sind schwarz dargestellt, mit abnehmender Farbtiefe folgen schräge, horizontale und zuletzt weite Schraffierung.

Im ersten Versuch (siehe Abb. 1) wurden Avidinmengen von 200γ auf die Enden von Papierelektrophoresestreifen aufgetragen, die vorher mit Teorell-Stenhagen-Puffer getränkt waren. Der pH-Wert des Puffers wurde in dieser Serie von Trennung zu Trennung jeweils um 1 pH-Einheit erhöht; ausgegangen wurde von einem pH von 2,0, der höchste pH-Wert betrug 12,0. Die Streifen wurden so in die Kammern gelegt, daß jeweils ein Streifen anodisch, der andere kathodisch 3 Stunden bei einer Spannung von 200 V lief.

Es ist zu erkennen, daß bei pH 2 und 4 eine anodische, eine kathodische und eine auf dem Auftrageort liegengebliebene Fraktion zu finden waren, deren Anfärbbarkeit und Wegstrecke übereinstimmen. Das Pherogramm von pH 3 zeigt eine Bandenverteilung, die der bei pH 8 im wesentlichen entspricht. In den mittleren pH-Bereichen (5-8) konnten vier Komponenten unterschieden werden, deren Färbbarkeit unterschiedlich war; am stärksten angefärbt war die am weitesten anodisch gewanderte Fraktion (schräg schraffiert), am schwächsten die am weitesten kathodisch gewanderte Fraktion (weit schraffiert). Die der Auftragstelle näherliegenden Banden waren mittelstark (horizontal schraffiert). Die im basischen pH-Bereich (9-12) gewanderten Fraktionen zeigten eine größere Übereinstimmung in Anfärbbarkeit und Wegstrecke; hier fanden sich aber nur eine kathodische und zwei anodische Komponenten.

In einer zweiten Versuchsserie (Abb. 2) wurden 400γ Avidin wiederum in Endauftragung in einem Sörensen-Phosphat-Puffer drei Stunden einer Spannung von 200 V ausgesetzt. Die Wiedergabe der Trennergebnisse ist die gleiche wie in Abb. 1. Es wurde ein pH-Bereich von pH 5 - 8 bei einer pH-Abstufung von 0,5 pH-Einheiten gewählt. Bei pH 6 - 8 zeigt sich eine Übereinstimmung

der Färbbarkeit; hier sind die weiter kathodisch und die langsamer anodisch gewanderten Fraktionen die stärksten. Die Wanderungsgeschwindigkeiten der Einzelbanden waren bei allen H-Ionenkonzentrationen annähernd gleich.

Im dritten Versuch wurde wiederum der Sörensen-Phosphat-Puffer in gleichem Bereich und Intervall verwendet. Diesmal trugen wir dieselbe Avidinmenge in der Mitte des Streifens auf. Wir erhielten dabei im Gegensatz zu der zweiten Versuchsserie nur drei Fraktionen, die alle viel gedrängter um die Auftragestelle herumlagen (s. Abb. 3). Meist blieb eine Fraktion in der Mitte liegen; die kathodische Komponente wurde besonders stark angefärbt (schwarz).

In allen drei Versuchsreihen wurden beide Avidin-Präparate unter jeweils denselben Bedingungen getrennt. Wir konnten keine Unterschiede in Anfärbbarkeit und Wanderungsgeschwindigkeit feststellen. Die Ungenauigkeiten der Wanderungsgeschwindigkeit sind auf folgende, die Elektrophorese beeinflussende Faktoren zurückzuführen:

1. pH-Wert und Ionenstärke
2. Elektroosmose
3. Diffusion der Kolloidteilchen
4. Wärmekonvektion
5. Sog im Papier
6. Umkehreffekte
7. Schwemmeffekte

Dieser letzte Faktor erklärt auch die Zusammendrängung der Komponenten in Abb. 3. Versuche, das Spektrum durch eine länger dauernde Stromeinwirkung oder Verdoppelung der Ionenstärke zu spreiten, mißlangen; man erhielt lediglich ineinanderlaufende Fraktionen, die sich nicht differenzieren ließen.

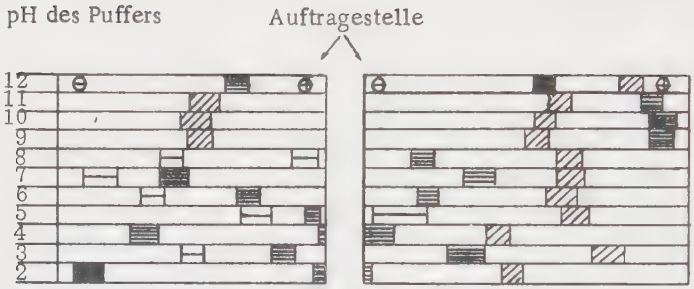


Abb. 1

Abb. 1 zeigt die elektrophoretische Auftrennung von Avidin im pH-Bereich zwischen 2,0 bis 12,0, es wurde je ein Streifen anodisch und ein Streifen kathodisch 3 Stunden bei 200 V in der mit Teorell-Stenhagen-Puffer gefüllten Trennkammer gelassen. Auf jedem Streifen befand sich 200γ Avidin (Die Anfärbbarkeit unterteilen wir in 4 Grade: Schwarz sind die stärksten Komponenten, in abnehmender Reihenfolge schräg schraffiert, horizontal- und weit schraffiert).

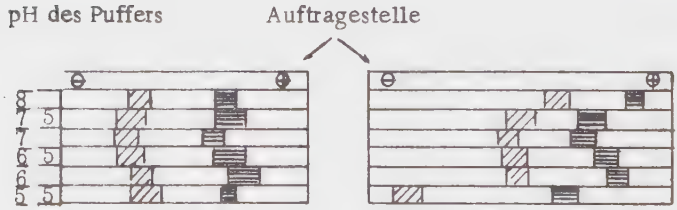


Abb. 2

Abb. 2 zeigt die Auftrennung in Sörensen-Phosphat-Puffer im pH-Bereich 5,5 - 8,0. Es wurden 400γ Avidin aufgetragen; sonstige Angaben siehe Abb. 1. Die oben notierten Buchstaben bezeichnen die Fraktionen, die später für die Fettsäuresynthese verwendet wurden.

pH des Puffers

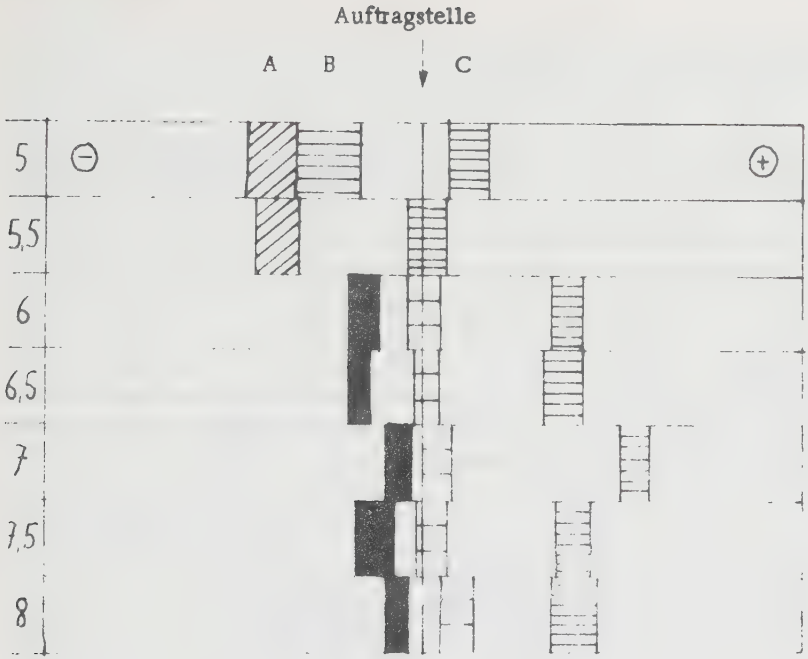


Abb. 3

Abb. 3 zeigt die Auftragung von 400 γ Avidin bei sonst gleichen Bedingungen wie in Abb. 1 u. 2, auf die Mitte des Elektrophoresestreifens im pH-Bereich 5,0 - 8,0. Die Buchstaben bezeichnen wiederum die später verwandten Fraktionen.

2. Der Einfluß von Avidin und seiner elektrophoretisch aufgetrennten Fraktionen auf die Fettsäuresynthese

Bei den Untersuchungen über die Beeinflussung des fettsäuresynthetisierenden Leberenzymsystems durch Avidin und seine papierelektrophoretisch aufgetrennten Einzelfraktionen mußte zuerst die Einwirkung des Papiers auf die enzymatische Syntheseaktivität festgestellt werden. Zu diesem Zweck wurde eine den elektrophoretischen Einzelbanden entsprechende Papierfläche in Form kleiner Schnitzel zum Inkubationssystem gegeben. Wie die Tab. 1 erkennen läßt, kam es durch diesen Papierzusatz in einigen Fällen zu einer unterschiedlichen Verminderung des 14 C-Einbaus in die langkettigen Fettsäuren im Vergleich zum unbeeinflußten Inkubationssystem. Diese Störung der Syntheseaktivität durch das Papier kann vielleicht mit einer teilweisen Adsorption der Enzymproteine an das Papier erklärt werden.

Zur Feststellung, ob papiergebundenes Avidin in gleicher Weise wie freies Avidin durch Biotin-Bindung die Fettsäuresynthese hemmt, wurden 250 und 500 γ Avidin auf einen puffergetränkten, 4 x 0,5 cm großen Papierelektrophoresestreifen aufgetragen, dieser zerschnitzelt und dann zum Enzymsystem zugegeben. Das Ergebnis dieser Untersuchungen findet sich ebenfalls in der Tab. 1. Durch den Avidinzusatz wird die Fettsäuresynthese in Abhängigkeit von der zugegebenen Avidinmenge weitgehend gehemmt. Aus den Versuchen ergibt es sich, daß durch Verdopplung der Avidinmenge die Syntheserate auf jeweils die Hälfte reduziert wird. Nach diesen Ergebnissen scheint das verwendete Nachweissystem - zumindest für größere Avidinmengen - eine zuverlässige Möglichkeit zur Erkennung von Avidin zu sein.

Mit Hilfe dieses enzymatischen Nachweises sollten nun die einzelnen, elektrophoretisch aufgetrennten Fraktionen zweier handelsüblicher Avidinpräparate auf ihre intakte Avidinnatur, d.h. auf ihre Fähigkeit zur Biotinbindung, untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden jeweils 400 γ Avidin im Sörensen-Phosphat-Puffer bei pH 7,5 sowie im Sörensen-Citrat-Puffer bei pH 3,0 aufgetrennt. Zur Festlegung der Substanzbanden wurde von den Elektropherogrammen ein 4 mm breiter Streifen abgeschnitten und mit Amidoschwarz angefärbt. Entsprechend dieser Leitstreifen wurde der verbliebene Hauptteil der Pherogramme zerschnitten und die einzelnen Fraktionen - wie beschrieben - in Form kleiner Papierstücke in die Inkubatoren gegeben. Die Tabellen 2 und 3 geben die dabei erhaltenen Ergebnisse wieder. Als Fraktionen a und b sind die kathodenwärts, als c und d die anodenwärts gewanderten Fraktionen bezeichnet. Fraktion a und Fraktion d besaßen jeweils die größere Wanderungsgeschwindigkeit. Es ergab sich in beiden pH-Bereichen,

daß die am stärksten kathodenwärts gewanderten Fraktionen a und die am wenigsten anodenwärts gewanderten Fraktionen c Avidinwirkung im Sinne einer fast totalen Hemmung der Fettsäuresynthese aufwiesen. Die beiden anderen Banden b und d besaßen keinerlei Hemmwirkung. Es handelt sich bei ihnen also wahrscheinlich entweder um eiweißartige Verunreinigungen der Präparate oder um inaktivierte Avidinanteile.

Es wurden dann in gleicher Weise die Eiweißbanden von Pherogrammen untersucht, bei denen Avidin ebenfalls in einer Gesamtmenge von 400 µ auf der Streifenmitte aufgetragen worden war. Als Puffer dienten dabei wieder der Sörensen-Phosphat-Puffer mit pH 7,5 und der Sörensen-Citrat-Puffer mit pH 3,0. Hier ergab sich eine Auftrennung entsprechend der Abb. 3 in 3 Banden. In den Tabellen 4 und 5 bezeichnet a die kathodenwärts gewanderte, b die auf der Auftragsstelle liegengebliebene und c die anodisch gewanderte Fraktion. In dieser Serie zeigte nur die jeweils zur Anode gewanderte Komponente eine Hemmwirkung. Die Wasserstoff-Ionenkonzentration besaß auf den Trennverlauf also keinen Einfluß.

	Leerwert ohne Papier	Papierwert ohne Avidin	250 γ Avidin	500 γ Avidin
Versuch 1	100	79	46,5	23,5
Versuch 2	100	43	18,5	12,0
Versuch 3	100	103	16,5	8,0

Tabelle 1: Eine einprozentige Avidinlösung wurde hergestellt und 250 γ bzw. 500 γ Avidin auf einen vorher puffergetränkten und getrockneten Elektrophoresestreifen (4 x 0,5 cm) pipettiert und mit dem Enzymsystem als Papierschnitzel inkubiert. Die Zahlen geben jeweils aus den vom Zählgerät angegebenen Impulsen berechnete Prozentzahlen an. Der Leerwert ist jeweils mit 100 % angenommen und auf ihn sind - für jeden Versuch getrennt - die einzelnen Syntheseraten bezogen.

pH 7,5	Leerwert ohne Papier	Papierwert ohne Avidin	A	B	C	D
Versuch 4	100	74,5	6,5	116	4	105
Versuch 5	100	100	3,0	80	3	89
Versuch 6	100	115	11,5	131	8	103
Versuch 7	100	114	6,0	129	10	104
pH 3,0						
Versuch 8	100	95	11	83	15	76
Versuch 9	100	90	19	91	18	87

Tabelle 2
Tabelle 3 : Beide Tabellen unterscheiden sich lediglich in ihrem pH-Wert. Diese Versuche zeigen den Einfluß auf die Fettsäuresynthese bei Inkubation der einzelnen Fraktionen von 400µ elektrophoretisch aufgetrenntem Avidin. Dabei wurde 1/10 des Streifens - 4 mm breiter Längsstreifen - abgeschnitten und zur Lokalisation der Fraktionen angefärbt. Von dem Hauptteil des Streifens wurden die entsprechenden Komponenten herausgeschnitten und inkubiert. pH 7,5 wurde aus Sörensen-Phosphat-, pH 3,0 aus Sörensen-Citrat-Puffer hergestellt. Die Zahlen im Tabellenkopf bedeuten: A und B sind die Fraktionen, die zur Kathode gewandert sind, wobei A am weitesten wanderte; C und D sind die anodischen Komponenten, bei denen D die weite anodische war (siehe dazu Abb. 2). Avidincharakter zeigen die Fraktionen A und C. In den einzelnen Versuchen wurden die Syntheseraten wieder auf den jeweiligen Leerwert bezogen.

pH 7,5	Leerwert ohne Papier	Papierwert ohne Avidin	A	B	C
Versuch 10	100	73	97	87	16
Versuch 11	100	92	109	96,5	7
Versuch 12	100	86	96	96,5	10
pH 3,0					
Versuch 13	100	97	85	77	8
Versuch 14	100	91	97	95	16

Tabelle 4
Tabelle 5 : unterscheiden sich wieder nur im pH-Wert. Sie zeigen die inkubierten Fraktionen nach Mittelauftrag (Abb. 3). Sonstige Angaben siehe Tab. 2 und 3. Die hemmende Komponente C ist die anodische, während die liegengebliebene und die kathodische Fraktion keinen Avidincharakter zeigen.

3. Der Einfluß von elektrophoretisch aufgetrennten Serum- und Serum-Avidinfraktionen auf die Fettsäuresynthese

Zur Klärung der Frage, ob sich unter den Serumeiweißstoffen solche mit Avidincharakter befinden bzw. ob Avidin in den elektrophoretischen Serumfraktionen enthalten oder von solchen transportiert wird, wurden folgende Versuche durchgeführt:
4 µl Humanserum stoffwechselgesunder Personen wurden unter üblichen Bedingungen (Michaelis-Puffer pH 8,6, 100 Volt, 16stündige Laufzeit) aufgetrennt und das Pherogramm in die Albumin-, α_1-, α_2-, β- und γ-Globulinbande zerschnitten. Diese Abschnitte wurden wieder, wie beschrieben, auf ihren Einfluß auf das fettsäuresynthetisierende Enzymsystem untersucht. Nach Tab. 6 und Abb. 4 ließ sich in keinem Fall eine von dem Papierwert abweichende Syntheserate ermitteln.

In einer 2. Versuchsserie (Tab. 7, Abb. 5) wurden 4 µl eines ähnlichen Serums zusammen mit 400 γ Avidin aufgetrennt. Bei der Untersuchung der

Beeinflußbarkeit des Enzymsystems wurde im Albumin-, noch stärker aber im γ-Globulin-Bereich eine deutliche Hemmwirkung gefunden. Die Hemmwirkung durch die γ-Globuline entsprach in diesem Fall etwa der des reinen Avidins, wie ein Vergleich mit der Tab. 1 nahelegt.

In den weiteren Versuchen wurde unter beibehaltung der Serummenge der Avidinzusatz fortlaufend reduziert. Bei der Auftrennung von 4 µl Serum mit 200 γ Avidin lag die Syntheserate für den γ-Globulinbereich etwa doppelt so hoch wie im vorausgegangenen Versuch. Auch der Albuminanteil zeigte eine Verringerung der Hemmwirkung. Bei einem Avidinzusatz zum Serum von 80 γ verringerte sich die Hemmwirkung des γ-Globulinbereiches auf etwa 60 %, während in keiner der anderen Serumeiweißfraktionen sich eine vom Leerversuch abweichende Einwirkung auf das Inkubationssystem nachweisen ließ. Bei den Versuchen mit 40 γ und mit 20 γ Avidinzusatz wurde im Vergleich zum Serumleerversuch keinerlei Hemmwirkung mehr gefunden. Danach ist in diesem Konzentrationsbereich die Empfindlichkeit der angewendeten Nachweismethode zur exakten Erfassung einer Avidinwirkung nicht mehr ausreichend.

Serum	Leerwert	Papierwert	Albumin	α_1	α_2	ß	γ
				Globuline			
Versuch 15	100	76	79	97,5	84	81,5	70,5
Versuch 16	100	80,5	78	89,5	81,5	72,5	76
400 γ Avidin							
Versuch 17	100	88	39	69	85	70	15
Versuch 18	100	77,5	48	73	83,5	67	7
200 γ Avidin							
Versuch 19	100	93,5	57	82	81	92,5	29,5
Versuch 20	100	78,5	56,5	71	74,5	76	32
80 γ Avidin							
Versuch 21	100	96	79	96,5	98,5	93	64,5
Versuch 22	100	91,5	84	98	100	97	61
40 γ Avidin							
Versuch 23	100	98	89,5	90	96	88	79,5
Versuch 24	100	95,5	87	93	98	86	75
20 γ Avidin							
Versuch 25	100	90	86	94,5	92	99	95,5
Versuch 26	100	89	89	93	95	105	96

Tab. 6 - 11: In dieser Reihe wurden 0,004 ml Humanserum mit unterschiedlichen Avidinmengen aufgetragen und 16 Stunden bei 100 V, pH 8,6 in der Trennkammer unter einem Stromfluß Kathode zur Anode belassen. Die Zahlen geben wieder Prozentwerte an, die aus den registrierten Impulsen errechnet wurden. Für jeden einzelnen Versuch wurde der entsprechende Leerwert mit 100 % eingesetzt.

In Tab. 6 wurde nur Serum aufgetrennt, wir fanden keine Hemmung.

In Tab. 7 wurde Serum mit 400 γ Avidin getrennt; die Ergebnisse zeigen, daß der Hauptteil des Avidins die γ-Globulinfraktion als Träger benutzte; ein Teil des Avidins wanderte auch mit der Albuminkomponente.

In Tab. 8 wurde Serum mit 200 γ Avidin getrennt; dabei trat die Hemmung in den gleichen Fraktionen auf.

In Tab. 9 wurde Serum mit 80 γ Avidin getrennt; die Synthese wurde nur noch im γ-Globulin-Bereich gehemmt.

In Tab. 10 wurde Serum mit 40 γ Avidin getrennt; hierbei fanden wir keine Hemmung.

In Tab. 11 wurde Serum mit 20 γ Avidin getrennt; dabei war ebenfalls keine Hemmung festzustellen.

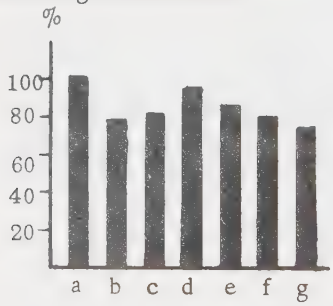
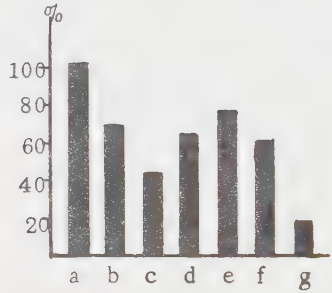


Abb. 4



a) Leerwert ohne Papier
b) Papierwert
c) Albumin
d) α 1
e) α 2
f) β
g) γ
} Globulin

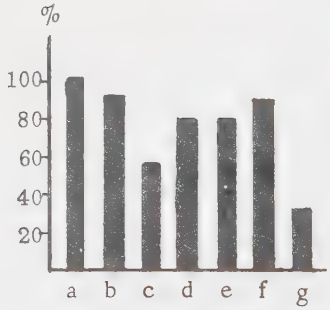


Abb. 6

Abb. 4 gibt die Ergebnisse der Tab. 6 wieder; wir sehen hier die Syntheseraten der einzelnen Serumfraktionen ohne Avidinzusatz.

Abb. 5 gibt die Resultate der Tab. 7 wieder; es wurden hier die Auftrennung von Serum + 400 γ Avidin inkubiert.

Abb. 6 ist der Tab. kongruent, die die Syntheseraten von den Fraktionen gemeinsam getrennten Serums + 200 γ Avidin wiedergibt.

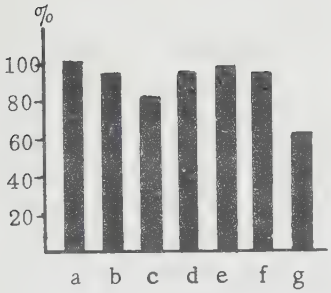


Abb. 7

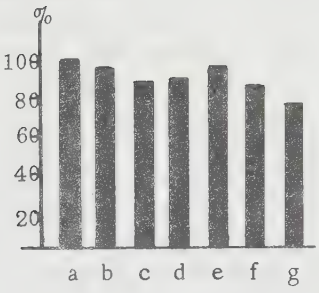


Abb. 8

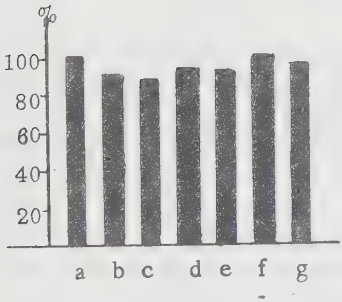


Abb. 9

a) Leerwert ohne Papier
b) Papierwert
c) Albumine
d) α_1
e) α_2
f) ß
g) γ

Globulin

Abb. 7 entspricht den Ergebnissen der Tab. 9, Serum + 80 γ Avidin
Abb. 8 entspricht den Ergebnissen der Tab. 10, Serum + 40 γ Avidin
Abb. 9 entspricht den Ergebnissen der Tab. 11, Serum + 20 γ Avidin

4. Der Einfluß von Avidin auf die Zusammensetzung der durch das Enzymsystem synthetisierenden Fettsäuren

Als letztes sollte festgestellt werden, ob es unter der Einwirkung des Avidins zu einer Änderung in der Zusammensetzung der durch das Enzymsystem synthetisierten Fettsäuren kommt oder ob die Depression der Syntheserate alle neu gebildeten Fettsäuren gleichmäßig betrifft. Zu diesem Zweck wurden die Gesamtlipoide aus den Inkubationssystemen mit der 20-fachen Menge Chloroform-Methanol (Mischungsverhältnis 2 : 1) extrahiert und deren Fettsäuren durch Umesterung mit 5 %iger methanolischer Salzsäure in 30fachem Überschuß dargestellt. Die aus dem Reaktionsansatz isolierten Fettsäuremethylester wurden dann gaschromatographisch in die einzelnen Komponenten aufgetrennt. Anschließend wurde ein kleiner Teil zur Erfassung der Massenkonzentrationen einem Argondetektor zugeführt, der größere Teil aber zu CO_2 verbrannt und nach Absorption des entstandenen Wassers durch eine mit Anthracen als Szintillator gefüllten Zelle geleitet. Die bei der Wechselwirkung zwischen der ß-Strahlung und den Anthracenkristallen auftretenden Lichtblitze wurden mit Hilfe von Photomultipliern in einer Zählapparatur registriert. Ein Blockbild dieser Versuchsanordnung, wie sie von KARMEN und Mitarbeitern (1962) angegeben wurde, zeigt die Abb. 10.

Als Gaschromatograph wurde das Modell 7504 der Firma Packard Instruments verwendet. Die Säulentemperatur betrug 195 °C, die Temperatur des Probenverdampfers 270 - 280 °C und die des Detektors 210 °C. Die Strömungsgeschwindigkeit des Trägergases Argon wurde bei einem Druckabfall längs der Säule von 1,5 - 1,7 kg/cm^2 auf etwa 100 - 120 ml/min eingestellt. Dabei hatten die Trennsäulen eine Länge von 1,8 m und einen Innendurchmesser von 0,4 - 0,6 cm. Die Säulenfüllung bestand aus Kieselgur 80 - 100 mesh, das mit einer 20 %igen Belegung von Bernsteinsäureäthylenglykolpolyester als stationärer Phase imprägniert war. Der Ionisationsdetektor wurde mit einer Spannung von 500 Volt betrieben. Der Verbrennungsofen hatte eine Temperatur von 750 °C. Der Innendurchmesser des Verbrennungsrohres betrug 6 mm; es war in 20 cm Länge mit Kupferoxyd in Drahtform gefüllt. Anschließend folgt zur Absorption des Wassers eine etwa 10 cm lange Schicht aus Magnesiumperchlorat. Das Teilungsverhältnis für den durch den Radioaktivitätsdetektor und den durch den Massendetektor geleiteten Gasanteil wurde auf etwa 10 : 1 eingestellt. In der Abb. 11 ist das auf diese Weise registrierte Ergebnis einer Auftrennung der Fettsäuren aus einem unbeeinflußten Inkubationssystem wiedergegeben, in der Abb. 12 ein solches mit Avidinzusatz. Der dünn wiedergegebene Kurvenzug gibt die jeweils registrierte Massenkonzentration, der

stärkere die Radioaktivität wieder. Es ist zu beachten, daß die beiden Schreibfedern zur Vermeidung einer gegenseitigen Behinderung gegeneinander um 6 - 7 mm versetzt sind. Dadurch erklärt sich die Verschiebung der Radioaktivitätsmaxima gegenüber den Massenmaxima; in Wirklichkeit ergab sich kein Unterschied in den Retentionszeiten der Massen- und der Radioaktivitätsbanden.

Nach Abb. 11 ist das Hauptsyntheseprodukt des Taubenleberenzymsystems die Palmitinsäure. Außerdem werden noch beträchtliche Anteile Myristin- und Laurinsäure gebildet. Stearinsäure wird nur in geringem Umfang synthetisiert. Damit liegen in dieser Hinsicht in der Taubenleber ähnliche Verhältnisse vor wie nach den Untersuchungen von WAKIL und Mitarb. im gleichen Enzymsystem des Rattenfettgewebes. Demgegenüber hatten LYNEN und Mitarb. mit Bäckerhefe hauptsächlich Stearinsäure synthetisieren können.

Der Avidinzusatz bewirkte eine fast vollständige Hemmung der Fettsäuresynthese (siehe Abb. 12). Es hat den Anschein, als ob von dieser Hemmung die Bildung der Palmitin- und der Stearinsäure weit stärker betroffen war, als die der kürzerkettigen Säuren mit 10 bis 14 C-Atomen. Allerdings wurden die Verhältnisse nicht exakt quantitativ bestimmt.

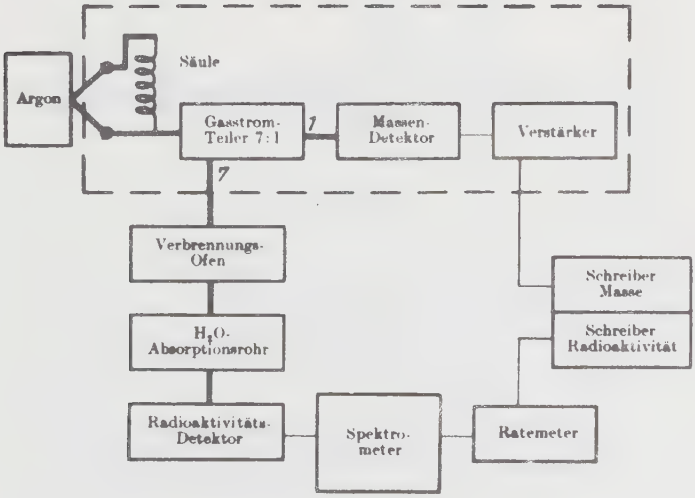


Abb. 10

Abb. 10: Blockbild der Versuchsanordnung zur gasomatographischen Trennung der Fettsäuren und zur gleichzeitigen Erfassung der Radioaktivität in den einzelnen Fettsäuren.

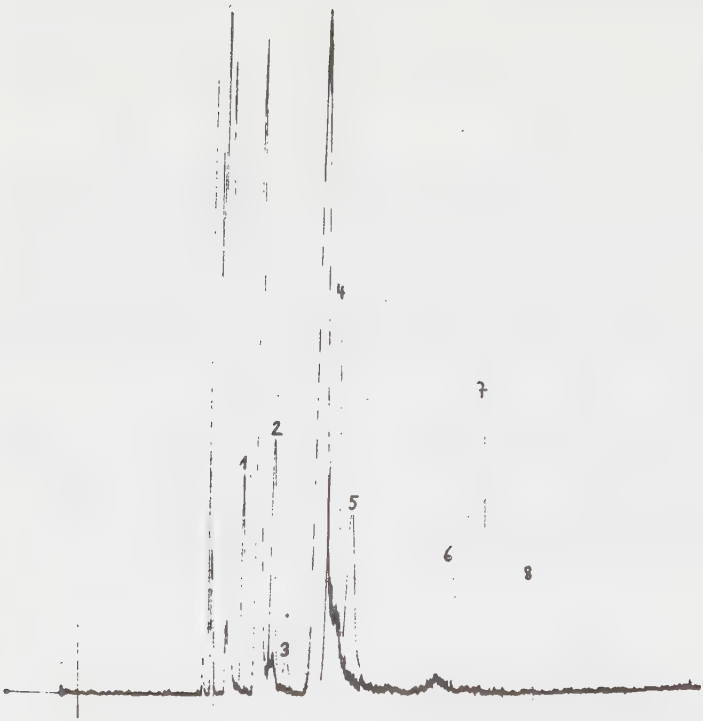


Abb. 11

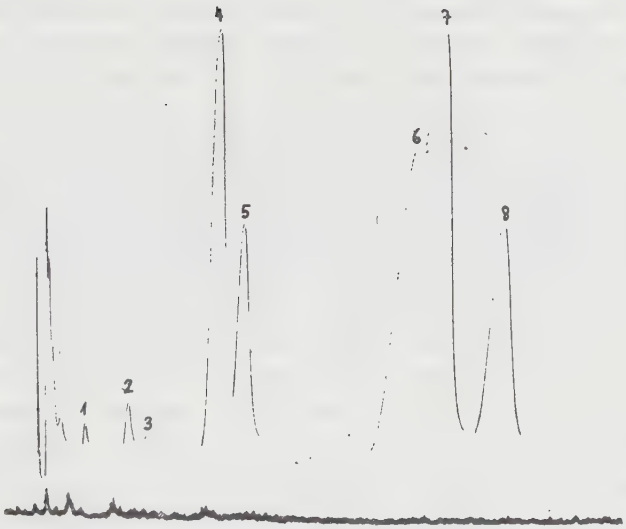


Abb. 12

Abb. 11
Abb. 12 : zeigen die Gaschromatogramme und die Verteilung der Radioaktivität der im Inkubationssystem synthetisierten Fettsäuren. Abb. 11 zeigt den Einbau ohne Avidin- , Abb. 12 mit Avidinzusatz, die Ziffern in der Abbildung bezeichnen folgende Säuren:

1 Laurinsäure, 2 Myristinsäure, 3 Myristoleinsäure,
4 Palmitinsäure, 5 Palmitoleinsäure, 6 Stearinsäure,
7 Ölsäure, 8 Linolsäure.

DISKUSSION

Die Zentralsubstanz des Intermediärstoffwechsels ist das Acetyl-CoA. Damit es zur Synthese der langkettigen Fettsäuren herangezogen werden kann, muß es zuvor in einer vorgeschalteten Reaktion zu Malonyl-CoA carboxyliert werden. Das hierfür verantwortliche Enzym ist die Acetylcarboxylase mit Biotin als prosthetischer Gruppe, die sich als limitierend für die Gesamtfettsäuresynthese ergeben hat (NUMA u. Mitarb. 1965). Dieses Enzym ist mit dem in Vogeleier- und Froscheiereiweiß vorkommenden Glykoprotein Avidin reversibel zu inaktivieren.

Das biologische Vorkommen des Avidins legt nun den Gedanken nahe, daß diese Substanz zumindest dem sich entwickelnden Vogel- und Froschembryo zum gleichen Zweck dienen könnte. Es besteht weiterhin die Möglichkeit, daß ganz allgemein im erwachsenen Tier und vielleicht auch beim Menschen Avidin eine regulierende Funktion auf die Fettsäuresynthese besitzt. In diesem Fall sollte sich diese Substanz auch im Serum nachweisen lassen, entweder weil es auf dem Wege der physiologischen Zellmauserung ins Blut gelangt oder weil das Blut an sich als Transportmittel für das Avidin dient, um es vom Ort seiner Bildung zu Erfolgsorgan oder -organen zu bringen.

Zum Nachweis des Avidins wurde das Enzymsystem aus Taubenlebern verwendet, das sich nach Ultrazentrifugation im klaren Überstand des Homogenats befindet, das also als nichtstrukturgebunden aus dem Cytoplasma der Leber stammt und zur Bildung von langkettigen Fettsäuren aus freiem Acetat in der Lage ist. Auf Avidinzusatz hin kommt es durch Bindung der Acetyl-CoA-Carboxylase zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der Syntheserate. Allerdings besaß der Test in der vorliegenden Form keine große Empfindlichkeit, denn bereits bei einem Zusatz von 40 γ Avidin ließ sich kein eindeutiger Effekt mehr nachweisen.

Bei der Untersuchung der Beeinflußbarkeit dieses Systems durch die 5 mit Hilfe der Papierelektrophorese auftrennbaren Serumeiweißstoffe von stoffwechselgesunden Personen wurde weder durch die Albumine noch durch eines der Globuline ein Effekt festgestellt. Wurde ein derartiges Serum in vitro mit Avidin behandelt, so ergab sich eine Hemmung durch den Albumin- und den β-Globulin-Bereich. Dabei besaß der den γ-Globulinen zuzuordnende Bereich der Elektropherogramme etwa die doppelte Hemmwirkung wie der Albuminbereich. Durch Erhöhung des Avidinzusatzes von 200 auf 400 γ erhöhte sich auch der durch beide Fraktionen erzielbare Effekt. Da das bei

den vorliegenden Versuchen zur Verfügung gewesene Avidin bei der papierelektrophoretischen Trennung unter ähnlichen Bedingungen sich in 2 - 3 Komponenten auftrennte, von denen aber nur eine in unserem Nachweissystem Avidincharakter besaß, muß angenommen werden, daß eine Aggregation des Avidins sowohl mit den γ-Globulinen als auch mit den Albuminen stattfand. Demnach sollte auch möglicherweise endogen gebildetes Avidin in diesen beiden Serumeiweißfraktionen enthalten sein. Obwohl der Avidinnachweis im nativen Serum nicht gelang, kann dadurch dessen tatsächliches Vorhandensein nicht ausgeschlossen werden. Wie bereits ausgeführt, besaß das angewendete Testsystem keine so große Empfindlichkeit, um die wahrscheinlich physiologischerweise in weit geringeren Konzentrationen vorliegenden Avidinmengen zu erfassen. Hier könnte die Entwicklung von beispielsweise immunologischen Verfahren eine weitere Steigerung der Empfindlichkeit bringen. Andererseits muß in Erwägung gezogen werden, daß etwa vorhandenes Avidin in Form einer inaktiven Vorstufe im Blutserum enthalten ist und erst im Erfolgsorgan in die eigentliche Wirkform umgesetzt wird.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Avidinpräparate verschiedener Herkunft wurden papierelektrophoretisch im pH-Bereich von 2 - 12 sowohl in anodischer wie kathodischer Laufrichtung aufgetrennt. Außerdem wurde in einer weiteren Serie die Substanz auf die Streifenmitte aufgetragen getrennt. Bei der Anfärbung mit Eiweißfarbstoffen ließen sich 2 bzw. 3 Banden nachweisen, von denen aber nur eine in dem verwendeten Nachweistest Avidincharakter besaß.

2. Die Serumeiweißstoffe von stoffwechselgesunden Personen wurden auf avidinähnliche Aktivität hin untersucht. Zu diesem Nachweis fand das langkettige Fettsäuren aus Acetat synthetisierende Enzymsystem von Taubenlebern Verwendung. Die Empfindlichkeit dieses Testes war relativ gering; es ließen sich nur Avidinmengen nachweisen, die über 40 γ pro Ansatz lagen. Keine der 5 papierelektrophoretisch trennbaren Serumproteinfraktionen zeigte einen Effekt im Sinne einer Avidinwirkung.

3. Bei der elektrophoretischen Auftrennung von Serum, das zuvor mit Avidin behandelt worden war, wurde Avidinaktivität bei den Albuminen und im γ-Globulinbereich nachgewiesen. Letzterer besaß etwa die doppelte Avidinwirkung wie die Albuminbande.

4. Mit Hilfe der Radiogaschromatographie wurde das Reaktionsprodukt des fettsäuresynthetisierenden Enzymsystems untersucht. Das Hauptsyntheseprodukt war die Palmitinsäure. Daneben wurden kleinere Mengen an Myristinsäure, Laurinsäure sowie Stearinsäure gebildet. Auf Avidinzusatz hin wurde die Synthese aller Fettsäuren fast vollständig gehemmt. Es hat den Anschein, daß unter der Avidineinwirkung die Kettenlänge der synthetisierenden Fettsäuren abnimmt.

Die vorliegende Arbeit wurde im Isotopenlabor der Medizinischen Poliklinik der Universität München unter Leitung von Herrn Dr. D. Eberhagen ausgeführt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. W. Seitz für das Überlassen des Themas und Herrn Dr. D. Eberhagen für seine Hilfe während der Versuche und bei der Korrektur der Arbeit.

LITERATUR

ALLEN, S.H.G., R. STJERNHOLM u. H.G. WOOD:	J. Bio.Chem. 238, p. 2889 (1963).
ANSELL, G.B. u. J.N. HAWTHORNE:	Phospholipids. Chemistry, Metabolism and Function. Elsevier Publ. Co., Amsterdam - London - New York (1964).
BLOCH, K.:	Lipid Metabolism, NY (1960).
BORTZ, W.M., S. ABRAHAM u. J.L. CHAIKOFF:	J. Biol. Chem. 238, p. 1261 (1963).
BORTZ, W.M. u. F. LYNEN:	Biochem. Z. 337, S. 505 (1963).
BRADY, R.O. u. S. GURIN:	J. Biol. Chem. 199, p. 421 (1952).
DU VIGNEAUD, V., K. DITTMER, K. HOFMANN u. D.B. MELVILLE:	Proc. Soc. exptl. Biol. Med. 50, 374 (1942).
EAKIN, R.E., E.E. SNELL u. R.J. WILLIAMS:	J. Biol. Chem. 136, p. 801 (1940).
EAKIN, R.E., E.E. SNELL u. R.J. WILLIAMS:	J. Biol. Chem. 140, p. 535 (1941).
FRAENKEL-CONRAT, K., N.S. SNELL u. E.D. DUCAY:	Arch. Biochem. Biophys. 39, p.80 (1952).
GIBSON, D.M.:	Fatty Acid Biosynthesis. In: R.T. HOLMAN, W.O. LUNDBERG u. T. MALKIN: Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids. Vol. VI, S. 118, Pergamon Press, Oxford - London - New York - Paris (1963).
GREEN, N.M.:	Biochem. Biophys. Acta 59, p. 244 (1962).
GREEN, N.M.:	Biochem. J. 89, p. 585 (1963 a).
GREEN, N.M.:	Biochem. J. 89, p. 599 (1963 b).

GREEN, N.M.: Biochem. J. 89, p. 609 (1963 c).

GREEN, N.M.: Biochem. J. 94, p. 23 c (1965).

GYÖRGY, P.: in: W.H. SEBRELL u. R.S. HARRIS: The Vitamins. Vol. 1, S. 526, Academic Press Inc., New York 1954.

HALENZ, D.R. u. M.D. LANE: J. Biol. Chem. 235, p. 878 (1960).

HERTZ, R., R.M. FRAPS u. W.H. SEBRELL: Proc. Soc. exptl. Biol. Med. 52, p. 142 (1943).

HERTZ, R., R.M. FRAPS u. W.H. SEBRELL: Science 100, p. 35 (1944).

HSU, R.Y., G. WASSON u. J.W. PORTER: J. Biol. Chem. 240, p. 3736 (1965).

KAZIRO, Y., E. LEONE u. S. OCHOA: Proc. Natl. Acad. Sci. 46, p. 1319 (1960).

KAZIRO, Y., L.F. HASS, P.D. BOYER u. S. OCHOA: J. Biol. Chem. 237, p. 1460 (1962).

LYNEN, F.: Liebigs Ann. 552, p. 276 (1942).

LYNEN, F.: Federation Proc. 12, p. 683 (1953).

LYNEN, F.: J. Cell Comp. Physiol. 54, Suppl. 1, p. 33 (1959).

LYNEN, F.: Federation Proc. 20, p. 941 (1961).

LYNEN, F. u. K.L. ROMINGER: Federation Proc. 22, p. 537 (1963).

LYNEN, F., I. KESSEL u. H. EGGERER: Mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse der Bayerischen Akademie der Wissenschaften. Sitzung v. 4. März 1960.

LYNEN, F., J. KNAPPE, E. LORCH, G. JÜTTING u. E. RINGELMANN: Angew. Chemie 71, S. 481 (1959a).

LYNEN, F., J. KNAPPE, E. LORCH, G. JÜTTING u. E. RINGELMANN: Die biochemische Funktion des Biotins. Sitzungsbericht der mathematisch-naturwissenschaftlichen Klasse der Bayerischen Akademie der Wissenschaften (1959b).

LYNEN, F., J. KNAPPE, E. LORCH G. JÜTTING, E. RINGELMANN u. J.P. LACHANCE: Biochem. Z. 335, S. 123 (1961).

LYNEN, F., M. MATSUKASHI, S. NUMA, E. SCHWEIZER: in: I.K. GRANT: The control of lipid metabolism 43, Academic Press, N.Y. (1963).

MARTIN, D.B., P.R. VAGELOS: J. Biol. Chem. 237, p. 1787 (1962).

MASORO, E.J.: J. Lipid Res. 3, p. 149 (1962).

MELAMED, M.D. u. N.M. GREEN: Biochem. J. 89, p. 591 (1963).

MELVILLE, D.B., J.G. PIERCE u. C.W.H. PARTRIDGE: J. Biol. Chem. 180, p. 299 (1949).

NORUM, K.: Acta Chem. Scand. 17, p. 896 (1963).

NORUM, K. u. J. BREMER: Biochem. Biophys. Acta 78, p. 77 (1963).

NUMA, S., W.M. BORTZ u. F. LYNEN: Advanc. Enzym. Regul. 3, p. 407 (1965).

RITTENBERG, D. u. K. BLOCH: J. Biol. Chem. 160, p. 417 (1945).

SCHAEFFER, J.J. u. P.S. BHARGAVA: Biochem. Biophys. Res. Commun. 14, p. 468 (1964).

SCHWEIZER, E., D. OESTERHELFT, W. CHAN, Ch. DUBA u. F. LYNEN: Zum Mechanismus der Fettsäuresynthese. 16. Mosbacher Kolloquium: Lipoide. 28. - 30. April 1965.

SEITZ, W. u. V. von BRAND: Z. ges. Inn. Med. Grenzgeb. 13, S. 764 (1958).

SPENCER, A.F., J.M. LÖWENSTEIN: J. Biol. Chem. 237, p. 3640 (1962).

SWICK, R.W. u. H.G. WOOD: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 46, p. 28 (1960).

TUBBS, P.K.: Biochem. Biophys. Acta 70, p. 608 (1963).

UTTER, M.F. u. D.B. KEECH: J. Biol. Chem. 235, p. 17 (1960).

VAGELOS, P.ROY, A.W. ALBERTS u. D.B. MARTIN: J. Biol. Chem. 238, p. 533 (1963).

VALLOTON, M. u. F. LEUTHARDT:	Helv. Chem. Acta 47, p. 311 (1964).
VILLINGER, C.:	Diss. München 1962.
VON BRAND, V.:	Biochem. Z. 331, S. 162 (1959).
VON BRAND, V. u. E. HELMREICH:	Biochem. Z. 238, S. 146 (1956).
WAITE, M. u. S.J. WAKIL:	J. Biol. Chem. 238, p. 77 (1963a).
WAITE, M. u. S.J. WAKIL:	J. Biol. Chem. 238, p. 81 (1963b).
WAKIL, S.J.:	J. Amer. Chem. Soc. 80, p. 4665 (1958).
WAKIL, S.J.:	Federation Proc. 19, p. 227 (1960).
WAKIL, S.J.:	J. Lipid Res. 2, p. 1 (1961).
WAKIL, S.J.:	The Biosynthesis of Fatty Acids in Animal Tissues. In: F.A. KUMMEROW: Metabolism of Lipids as Related to Atherosclerosis. S. 155 C.C. Thomas Publ. Springfield, Ill. USA (1965).
WAKIL, S.J. u. R. BRESSLER:	J. Biol. Chem. 237, p. 687 (1962).
WAKIL, S.J. u. D.M. GIBSON:	Biochem. Biophys. Acta 41, p. 122 (1960).
WAKIL, S.J., E.B. TITCHENER u. D.M. GIBSON:	Biochem. Biophys. Acta 29, p. 225 (1958).
WAKIL, S.J., D.M. GIBSON u. A. HARPER (1959)	- zit. bei GIBSON (1963).
WAKIL, S.J., L.W. MCLAIN, jr. u. J.B. WARSHAW.	J. Biol. Chem. 235, p. 31 (1960).
WHITE, D. u. H.P. KLEIN:	Biochem. Biophys. Res. Commun. 20, p. 78 (1965).
WIELAND, O. und L. WEISS:	Biochem. Biophys. Res. Commun. 13, p. 26 (1963).
WIELAND, O., L. WEISS, I. EGER-NEUFELDT, A. TEINZER u. B. WESTERMANN:	Klin. Wschr. 43, S. 645 (1965).
WOOLEY-LONGSWORTH:	J. Biol. Chem. 142, p. 285 (1942).

LEBENSLAUF

Am 25. 8. 1939 wurde ich, Andreas Pilger, als Sohn des technischen Kaufmanns Bernhard Pilger und seiner Ehefrau Edith, geb. Behrens, in Breslau geboren.

Nach der Flucht über Berlin im Jahre 1945 zogen wir nach Gevelsberg/Westf., wo mein Vater am 4. 12. 1949 starb. Ich absolvierte dort meine Schulzeit und legte am 8. 3. 1960 am Städt. math. -naturwissenschaftl. Gymnasium in Hagen-Haspe die Reifeprüfung ab.

Vom 1. 4. 1960 bis 31. 3. 1961 war ich Soldat. Zum Sommersemester 1961 immatrikulierte ich mich an der Universität Würzburg und blieb dort bis zum Abschluß des Wintersemesters 1962/63. Seither studierte ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München und habe am 28. Juni 1967 das medizinische Staatsexamen bestanden.